

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 20, 1982, pp. 799–805

Untersuchungen zur Bestimmung der α -Amylase mit *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid

Von J. D. Kruse-Jarres, F. J. Schott

Institut für Klinische Chemie am Katharinenhospital Stuttgart

B. Klein, N. Rastetter

Klinisch-Chemische und Experimentelle Laboratorien der Chirurgischen Universitätsklinik Freiburg und

K. Wallenfels

Lehrstuhl Biochemie am Chemischen Laboratorium der Universität Freiburg

(Eingegangen am 12. Februar/1. Juli 1982)

Zusammenfassung: Mit den Nitrophenylmaltodextrinen stehen Substrate zur Verfügung, die für die α -Amylase ein kontinuierliches Meßverfahren mit einer Kinetik 0. Ordnung über mindestens 10 Minuten ohne Abweichungen von der Linearität ermöglichen. Dabei ist nur ein Hilfsenzym notwendig. In der vorliegenden Arbeit wird die Praktikabilität und klinische Aussagekraft der α -Amylase-Bestimmung mit *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid untersucht. Die interserielle Präzision von 0,84% kann dabei nicht über eine nur mäßige Korrelation zu bisherigen Methoden hinwegtäuschen. Doch kann dies die Vorzüge nicht schmälern.

Studies on determinations of α -amylase with p-nitrophenyl- α -D-maltotetraoside

Summary: Nitrophenylmaltodextrins are α -amylase substrates which allow a continuous determination with a zero order kinetics over a period of at least 10 min, without deviations from linearity. Only one auxiliary enzyme is necessary. Practicability and clinical evidence of α -amylase determinations by means of *p*-nitrophenyl- α -D-maltotetraoside are demonstrated. The interserial precision of 0.84% cannot conceal an only moderate correlation with previous methods. This fact, however, does not negate the advantages.

Einführung

Die verschiedenen Methoden, die zur α -Amylasebestimmung im Serum entwickelt wurden, und von denen viele im Routinelabor Verwendung finden, haben nicht nur zur Klärung von Krankheitsbildern beigetragen, sondern auch durch ihre verschiedenen Substrate und Normbereiche, durch verschiedene Einheiten und durch unterschiedliche Störanfälligkeit, Genauigkeit und Spezifität (1–5) zu Verwirrung und Unsicherheit geführt.

Neben turbidimetrischen und elektrophoretischen Messungen (6), die vergleichsweise bedeutungslos sind, und einem Radioimmunoassay (4) kann man die heute angewandten Methoden zur α -Amylasebestimmung in 4 Gruppen einteilen:

a) Amyloklastische Methoden, bei denen der Abbau des Substrats durch Abnahme der Viskosität oder der Farbtintensität des charakteristischen Iod-Stärkekomplexes gemessen wird.

b) Saccharogene Methoden, bei denen die Freisetzung reduzierender Zucker aus löslich gemachter Stärke am Verbrauch chemischer Oxidationsmittel oder die durch Amylase gebildete Maltose durch gekoppelten enzymatischen Test bestimmt wird.

c) Chromolytische Methoden, bei denen mit Farbstoff kovalent vernetzte, unlösliche Stärke in lösliche, gefärbte Spaltprodukte übergeht, deren Menge photometrisch bestimmt wird.

d) Methoden, bei denen molekular einheitliche Maltodextrine mit 4–7 Glucoseeinheiten in α -1,4-Verknüpfung zu Maltose abgebaut werden, die in einem gekoppelten Test enzymatisch bestimmt wird.

Die α -Amylasebestimmung mit Stärke als Substrat kann wegen der unterschiedlichen molekularen Natur der Stärkemoleküle je nach Herkunft und Art der Vorbehandlung des benutzten Präparates nie zu vergleichbaren molekular interpretierbaren Ergebnissen führen. Dies

gilt sowohl für die Abnahme der Farbe des Iod-Stärke-komplexes als auch die Zunahme der löslichen, kovalent angefärbten Produkte oder der reduzierenden Gruppen. Bei den anderen Methoden mit verschiedenen langen Oligosacchariden resultieren wegen der unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber der α -Amylase unterschiedliche katalytische Aktivitäten und somit unterschiedliche Normbereiche (7). Deshalb sollte versucht werden, die α -Amylasebestimmung mit dem am besten zu definierenden Substrat in definierten Einheiten (U/l) (8, 9), und bei minimaler Störanfälligkeit der Reaktion zu optimieren und zu standardisieren. Dies erfordert die Erfüllung folgender Grundbedingungen für ein empfehlenswertes Verfahren zur α -Amylasebestimmung (10):

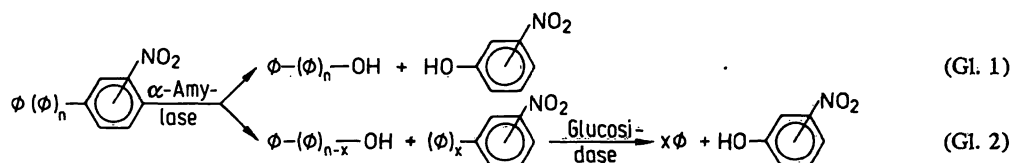
- Gebrauch eines molekular definierten Substrats, das in einem Reaktionsschritt zu molekular definierten Reaktionsprodukten führt, die leicht gemessen werden können,
- Ein kontinuierliches Meßverfahren mit einer Kinetik 0. Ordnung über mindestens 10 min ohne lag-Phase oder andere Abweichungen von der Linearität,

c) Eine Sensitivität, die genaue Bestimmungen innerhalb des normalen Aktivitätsbereichs erlaubt (bereits bei 30 °C, wie vom Expert Panel on Standards der IFCC empfohlen),

d) Fehlende Interferenz durch endogene Glucose.

Gegenwärtig werden saccharogene kontinuierliche Verfahren mit definierten Maltooligosacchariden in Testkombinationen zur Amylasebestimmung in verschiedenen Ausführungsformen vorgeschlagen (11, 12, 13).

Seit kurzem stehen nun Nitrophenylmaltodextrine zur Verfügung, die vor allem die Bedingung b) besser zu erfüllen erlauben (1, 14, 19). Diese Substrate werden durch enzymatischen Glucosetransfer von α -Cyclodextrin auf Nitrophenylglucosid und chromatographische Trennung des Reaktionsproduktes in die einzelnen Verbindungen mit 2–7 Glucoseeinheiten hergestellt (14). α -Amylase spaltet in ihnen die heterosidische α -Verknüpfung zwischen Zucker und Nitrophenol und/oder eine oder mehrere der α -1,4-Verknüpfungen von Glucoseresiden (Gleichung 1 und 2).



ϕ = 1,4-verknüpfte Glucose im Substrat

Die direkte Freisetzung von Nitrophenol nach Gleichung 1 ist optimal mit *o*-Nitrophenyl- α -D-maltotriosid und gut geeignet zur Amylasebestimmung in Drüsenextrakten und Sekreten (14). Für niedrige katalytische Aktivitäten, wie sie in Serum und Harn vorliegen, wird die wesentlich schnellere Spaltung nach Gleichung 2 benutzt, wobei Glucosidase aus den primär gebildeten Produkten in der Indikatorreaktion das Nitrophenol freisetzt. Zwar wird die Spaltung durch Amylase nach Gleichung 2 mit zunehmender Kettenlänge schneller, in gleichem oder noch höherem Maße nimmt aber die Geschwindigkeit der Spaltung durch Glucosidase ab (15). *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid erfüllt beide Forderungen: Es wird auch bei niedrigen katalytischen Aktivitäten in Serum und Harn genügend schnell von α -Amylase gespalten, und die beiden Hauptprodukte *p*-Nitrophenyl- α -D-glucosid und -maltosid sind gute Substrate des Indikatorzyms α -Glucosidase. Obwohl das Verhältnis der Bildung von Glucosid und Maltosid je nach Amylaseart unterschiedlich ist (15), sind keine exzessiven Mengen an α -Glucosidase erforderlich, um sicherzustellen, daß die Amylasereaktion geschwindigkeitsbestimmend bleibt und pro Mol Substrat 1 Mol Nitrophenol entsteht. Die Empfindlichkeit ist genügend groß, um Normwerte in Serum und Urin bei Verdünnung

von 1:10 bzw. 1:50 in der Küvette zu messen. Linearität ist bei katalytischen Aktivitäten zwischen 5 U/l und 1000 U/l gegeben, wenn die Glucosidasekonzentration bei 0,5 U/Test liegt.

Ziel der vorliegenden Arbeit soll es sein, die Praktikabilität und klinische Aussagekraft des Amylasetests mit *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid zu untersuchen, sowie die Korrelation zu einer herkömmlichen und in der Laborroutine häufig eingesetzten α -Amylase-Bestimmungsmethode darzustellen.

Material und Methoden

Materialien

- p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid (K. Wallenfels, Freiburg).
- Triethanolamin/HCl-Puffer 0,05 mol/l Triethanolamin, 0,02 mol/l CaCl_2 , pH 7,6.
- α -Glucosidase (EC 3.2.1.20) 100 kU/l (Boehringer Mannheim, Mannheim).
- Ultra Zyme Plus[®] α -Amyl (Harleco, Merz & Dade, München).
- EnzAmyl-K (Labordiagnostica Goedecke, Berlin, Freiburg).
- Bichromat-Analyzer (ABA 100) (Abbott, Langen).
- Seren, Urine und Duodenalsäfte von Patienten und Blutspendern der Universitätskliniken Freiburg.

Versuchsanordnung

1. Zur Bestimmung des *Referenzbereichs* wurden 156 Blutproben von Blutspendern 10 min bei 4000 min^{-1} zentrifugiert, jedes Serum in ein verschließbares Plastikgefäß dekantiert und bis zur Analyse bei -20°C eingefroren. Diese Seren wurden am ABA 100 sowohl mit der *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid-Methode als auch mit der Oligosaccharid-Methode (Harleco) analysiert.
2. Seren von 17 Patienten mit der klinischen Diagnose „*Pankreatitis*“ und 35 Seren, die bei der Routineuntersuchung mit der Oligosaccharid-Methode erhöhte α -Amylasewerte hatten, wurden ebenfalls mit der *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid-Methode auf dem ABA 100 analysiert. Diese Seren wurden 2 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. War die Messung nicht innerhalb von 2 Tagen möglich, wurden die Seren bei -20°C eingefroren. Voruntersuchungen hatten ergeben, daß dabei keine signifikanten Unterschiede der Enzymaktivitäten auftreten.
3. 55 *Urine*, bei denen eine Untersuchung mit der Oligosaccharid-Methode gefordert war, wurden mit *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid auf dem ABA 100 analysiert. Keine der Proben war älter als 2 Tage.
4. Es wurden je 2 Proben *Duodenalsaft* von 15 Patienten im Rahmen eines Sekretin-Pankreozymin-Tests untersucht. Dabei wurde das Sekret mit einer Duodenalsonde quantitativ aufgefangen und anschließend die Enzymaktivität bestimmt.

Methoden

1. *Seren* und *Urine* wurden mit Hilfe des *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid als Substrat am ABA 100 nach folgender Einstellung bestimmt:

Temperature	30 °C
Filter	450/415 nm
Syringe Plate	1:11
Mode Selection	Rate
Reaction Direction	Down
Analysis Time	5 min
Carousel Revolution	4
Decimal Point	000,0
Calibrate Factor	1500 (durch Kalibrierung mit der manuellen Methode ermittelt)
Zero	4000

Reaktionsgemisch

10 ml Triethanolamin/HCl Puffer	0,05 mol/l Triethanolamin 0,02 mol/l CaCl_2 pH 7,6
+ 10 mg <i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid	0,001 mol/l <i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid
+ 200 μl α -Glucosidase (20 U)	2 kU/l

Der zweite Ausdruck wurde ausgewertet (erster Meßwert nach 10 min), Messung gegen Reagenzienleerwert.

2. Für die α -Amylasebestimmung mit *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid im *Duodenalsaft* wurde folgende Einstellung am ABA 100 gewählt:

In die Probengefäße wurden 150 μl einer Verdünnung (1:41) gegeben aus
400 μl Humanalbumin (80 g/l)
+ 10 μl *Duodenalsaft*

Einstellung:

Temperature	30 °C
Filter	450/415 nm
Syringe Plate	1:26
Mode Selection	Rate
Reaction Direction	Down
Analysis Time	5 min
Carousel Revolution	4
Decimal Point	000,0

Calibrate Factor	1500 \times Verdünnungsfaktor $41 \times \frac{26}{11}$ (Spritzenplattenwechsel) = 145 364 (1454 wurde eingegeben, das Ergebnis wurde mit 100 multipliziert) so nah wie möglich an 4000
Zero	
Reaktionsgemisch	
10 ml Triethanolamin/HCl Puffer	0,05 mol/l Triethanolamin 0,02 mol/l CaCl_2 pH 7,6
+ 10 mg <i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid	0,001 mol <i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid
+ 300 μl α -Glucosidase (30 U)	3 kU/l

Auch hier wurde der zweite Ausdruck als Aktivitätsangabe ausgewertet (erster Meßwert nach 10 min), Messung gegen Reagenzienleerwert.

3. Die *Oligosaccharid*-Methode wurde im *Serum* und *Urin* entsprechend der Vorschrift der Hersteller (Harleco) am ABA 100 durchgeführt. Der *Duodenalsaft* wurde für diese Methode 1:41 mit Humanalbumin (80 g/l) verdünnt.

4. Die *Maltotetraose*-Methode (Goedecke) wurde entsprechend der Vorschrift der Hersteller ebenfalls am ABA 100 durchgeführt.

5. *Manuelle Methode* für den Test mit *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid als Substrat: Testzusammensetzung wie unter 1. für den ABA beschrieben, allerdings bei Wellenlänge 405 nm ($\epsilon = 1395 \text{ m}^2/\text{mol}$). Nach 10 min Inkubation wurden über 5 min die Absorptionsdifferenzen pro Minute registriert.

Statistik

Der Auswertung der Ergebnisse liegen folgende statistische Methoden zugrunde:

1. Mittelwert \pm Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$)
2. Regressionsgerade ($y = a + bx$)
3. Korrelationskoeffizient (r)

Ergebnisse

1. *Präzision* der verwendeten Analysenmethoden:

Die VK-Werte wurden jeweils in einer Serie mit 20 Werten am ABA 100 bestimmt. Dazu wurde ein Serum mit einer Amylase-Aktivität im oberen Normbereich verwendet.

p-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid-Methode VK 0,84%
 $\bar{x} = 12,2 \text{ U/l}$

Oligosaccharid-Methode VK 9,3%
 $\bar{x} = 96 \text{ U/l}$

Maltotetraose-Methode VK 2,1%
 $\bar{x} = 32,9 \text{ U/l}$

2. 156 Blutspenderseren wurden mit *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid auf ihre α -Amylaseaktivität untersucht, um einen *Referenzbereich* zu erstellen. Um diese Werte mit einer bekannten, gängigen Methode korrelieren zu können, wurden sie zusätzlich mit der Oligosaccharid-Methode untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß der vom Hersteller angegebene Normbereich von $< 100 \text{ U/l}$

deutlich niedriger liegt, wie die Ergebnisse der vorliegenden Referenzbereichsstudie zeigen:

$$n = 156 \quad \bar{x} = 65,6 \text{ U/l} \quad s = 26 \text{ U/l}$$

Daraus ergibt sich für die Oligosaccharid-Methode ein Referenzbereich $\bar{x} \pm 2s$ von 14–117 U/l.

Tabelle 1 zeigt den Referenzbereich für das *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid, der zusätzlich alters- und geschlechtsspezifisch berechnet wurde. Die geringe Abweichung des Bereichs der 41- bis 60jährigen dürfte auf eine kleinere Anzahl von Untersuchungen zurückzuführen sein. Ein Referenzbereich von 0–9 U/l (alters- und geschlechtsunabhängig) ergibt sich aus diesen Untersuchungen.

Tab. 1. Alters- und geschlechtsspezifische Referenzbereiche der α -Amylase, bestimmt mit der *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid-Methode. Werte in U/l.

	n	\bar{x}	δ_n	δ_{n-1}	Σx	Σx^2	s^2	$\bar{x} - 2s$ bis	$\bar{x} + 2s$
Alle	156	4,5	2,1	2,1	698,2	3820,6	4,4	0,3 bis	8,7
davon ♀	47	4,7	2,3	2,4	220,7	1291,9	5,8	0 bis	9,5
davon ♂	109	4,4	2,0	2,0	477,5	2528,7	4,0	0,4 bis	8,4
18–20 Jahre	30	4,4	2,0	2,1	132,6	709,5	4,4	0,2 bis	8,6
davon ♀	4	5,2	0,8	0,9	20,6	108,3	0,8	3,4 bis	7,0
davon ♂	26	4,3	2,1	2,2	112,0	601,2	4,8	0 bis	8,7
21–30 Jahre	87	4,4	2,2	2,2	385,6	2127,6	4,8	0 bis	8,8
davon ♀	33	4,5	2,4	2,5	148,0	858,4	6,3	0 bis	9,5
davon ♂	54	4,4	2,0	2,1	237,6	1269,2	4,4	0,2 bis	8,6
31–40 Jahre	20	4,4	1,4	1,5	87,2	420,6	2,3	1,4 bis	7,4
davon ♀	4	4,6	1,3	1,5	18,4	91,7	2,3	1,6 bis	7,6
davon ♂	16	4,3	1,4	1,5	68,8	328,9	2,3	1,3 bis	7,3
41–60 Jahre	19	4,9	2,4	2,5	92,8	562,8	6,3	0 bis	9,9
davon ♀	6	5,6	2,7	3,0	33,7	233,4	9,0	0 bis	11,6
davon ♂	13	4,5	2,2	2,2	59,1	329,4	4,8	0,1 bis	9,9

Der Vergleich der Ergebnisse der *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid-Methode mit denen der Oligosaccharid-Methode stellt sich wie folgt dar:

$$\begin{aligned} \text{Regressionsgerade} & \quad y = -0,25 + 15,9 x \\ \text{Korrelationskoeffizient} & \quad r = 0,84 \quad (\text{siehe Abb. 1}) \end{aligned}$$

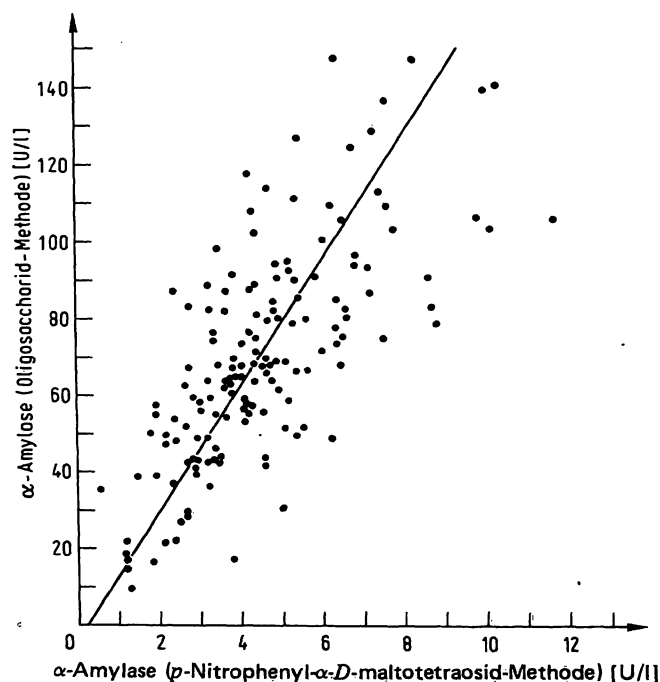


Abb. 1. Korrelation ($r = 0,84$) zwischen der *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid-Methode und der Oligosaccharid-Methode zur Bestimmung der α -Amylase in Serum gesunder Probanden ($n = 152$).

Der Vergleich der Ergebnisse der *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid-Methode mit denen der Maltotetraose-Methode stellt sich wie folgt dar:

$$\begin{aligned} y & = 2,71 + 0,47 x \\ r & = 0,87 \quad (\text{siehe Abb. 2}) \end{aligned}$$

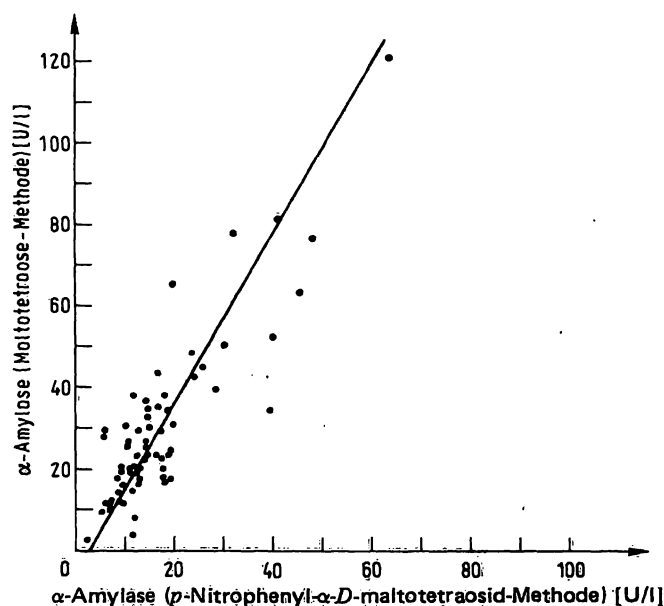


Abb. 2. Korrelation ($r = 0,87$) zwischen der *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid-Methode und der Maltotetraose-Methode zur Bestimmung der α -Amylase im Serum ($n = 66$).

Für die *Urine* wurde keine Referenzuntersuchung durchgeführt. Ein Referenzbereich wäre sehr wenig aussagekräftig, da sich der Uringehalt an α -Amylase an zu vielen unterschiedlichen Kenngrößen orientiert (α -Amylaseaktivität im Blut, Größe der renalen Kreatinin-Clearance, Größe der tubulären Reabsorption, Serumlysinkonzentration als Ursache einer Hemmung der tubulären Proteinrückresorption (16) etc.). Die Vergleichsuntersuchungen hatten folgende Ergebnisse (Abb. 3):

Substrat	n	Amylase	
		\bar{x} (U/l)	s (U/l)
<i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid	53	53	38,7
Oligosaccharid	53	318,1	292,6
Regressionsgerade	$y = -5,2 + 6,1 x$		
Korrelationskoeffizient	$r = 0,81$		

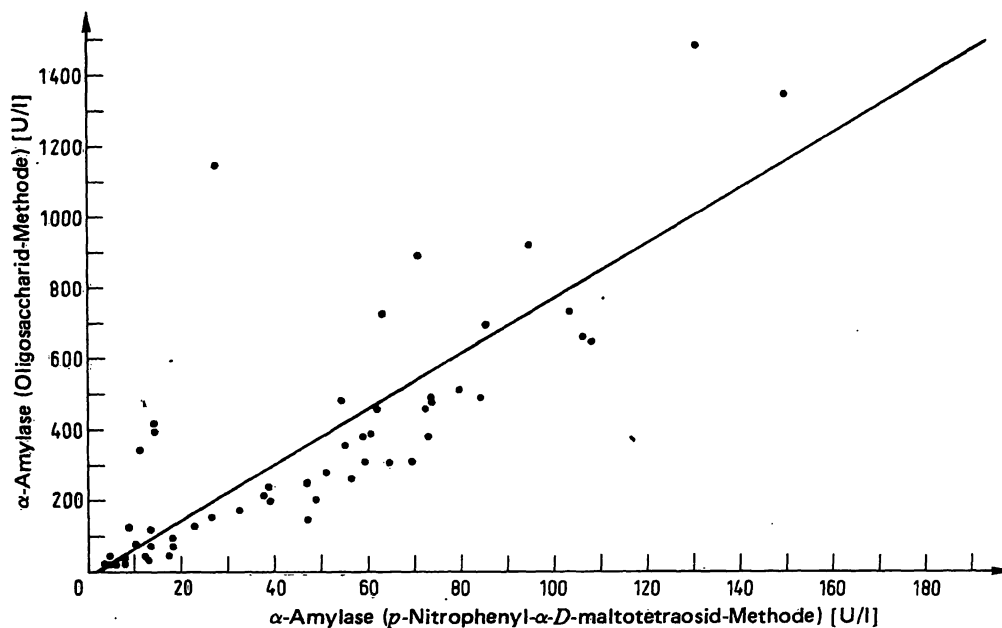


Abb. 3. Korrelation ($r = 0,81$) zwischen der *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid-Methode und der Oligosaccharid-Methode zur Bestimmung der α -Amylase im *Urin* ($n = 53$).

3. Die *Duodenalsäfte* stammen von Patienten mit exokriner Pankreasinsuffizienz, Lambliasis oder Papillitis stenisans. Proben von gesunden Probanden wurden nicht gewonnen, weswegen ein Referenzbereich nicht erstellt werden konnte. Wiederum wurde die *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid-Methode mit der Oligosaccharid-Methode korreliert (Abb. 4):

Substrat	n	Amylase	
		\bar{x} (U/l)	s (U/l)
<i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid	28	14152	6443
Oligosaccharid	28	94129	51678
Regressionsgerade	$y = -18521 + 7,96 x$		
Korrelationskoeffizient	$r = 0,995$		

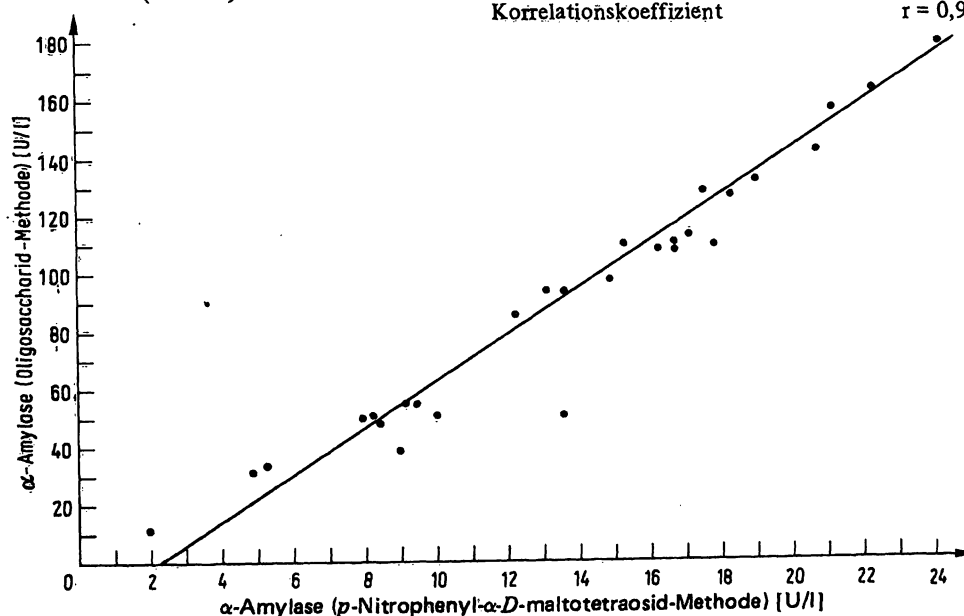


Abb. 4. Korrelation ($r = 0,995$) zwischen der *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid-Methode und der Oligosaccharid-Methode zur Bestimmung der α -Amylase im *Duodenalsaft* ($n = 28$).

4. Typische Verläufe von α -Amylaseaktivitäten im Serum bei verschiedenen Formen von *Pankreatitiden* sind in Abbildung 5 zu sehen. Es zeigte sich in 100% der klinisch gesicherten Fälle akuter Pankreatitiden oder akuter Schübe chronischer Pankreatitiden im Serum eine meist weit über der Norm von 9 U/l liegende Aktivität. Es wurde auch in keinem Fall ein „normales“ Ergebnis beobachtet, wo mit der Oligosaccharid-Methode eine Erhöhung angezeigt worden wäre.

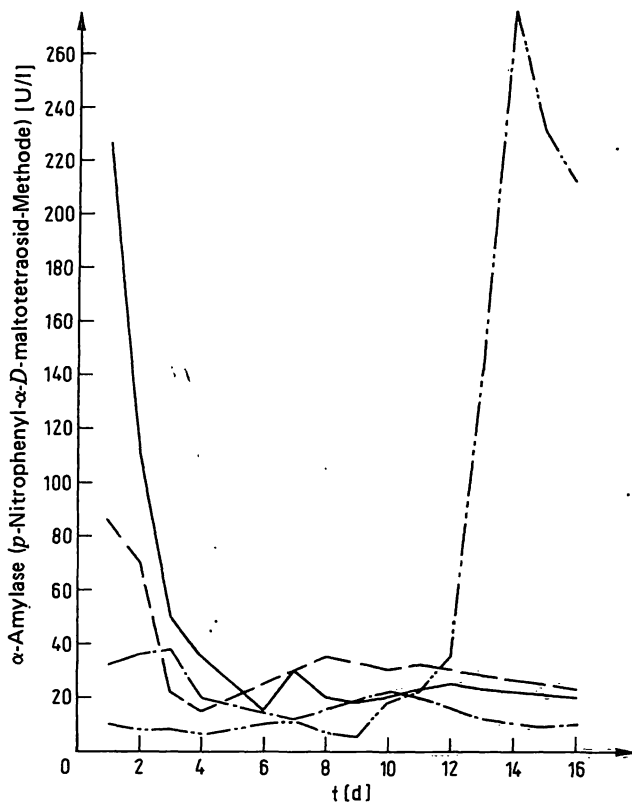


Abb. 5. Verläufe von α -Amylase-Aktivitätsmessungen mit der *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid-Methode bei verschiedenen Formen der *Pankreatitis*.

- Hämorrhagisch-nekrotisierende Pankreatitis.
- Akute nekrotisierende Pankreatitis.
- · - Akuter Schub, Alkohol-Pankreatitis.
- Nekrotisierende Pankreatitis bei Lungenembolie.

Andererseits fanden sich bei verschiedensten Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes ohne gesicherte Pankreasbeteiligung in 30% leicht über die Norm angeho-bene Erhöhungen der α -Amylaseaktivität mit *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid, wo die Oligosaccharid-Methode unauffällige Werte lieferte. Es handelt sich hierbei um Erkrankungen wie Ösophagus-Ca, Magen-perforation, stumpfes Bauchtrauma, Ulkusblutung, Magen-Ca, Mesenterialinfarkt oder Enteritis. Derartige Befunde wurden bei diversen Methoden immer wieder beobachtet und beschrieben (17).

Diskussion

In der Vergangenheit wurden viele Methoden benutzt, um α -Amylaseaktivitäten in den Körperflüssigkeiten zu messen. Diese Methoden waren zumeist zeitraubend, da

bei vielen von ihnen Erhitzen, Zentrifugieren, Filtrieren und Inkubation vor dem Beginn der eigentlichen Messung standen, um vor allem spätere Interferenzen mit endogener Glucose auszuschalten.

Es kommt des weiteren zu unüberwindbaren Ungenauigkeiten bei Methoden, mit denen die Reaktion — z. B. die Stärkespaltung — zu mehreren Produkten führt, die ihrerseits Substrate der α -Amylase sind. Bestimmungen müssen zudem unbefriedigend sein, bei denen die Reaktion nicht linear verläuft oder abgestoppt werden muß. Der nicht lineare Verlauf kommt z. B. bei den stärkespaltenden Methoden dadurch zustande, daß ein großes Stärkemolekül im Laufe der Zeit in viele kleinere, besser angreifbare Fragmente zerlegt wird. Die starke Erhöhung der molaren Substratkonzentrationen am Anfang des Reaktionsablaufes führt zu Aktivitätsschwankungen der Amylase; eine Auswertung in U/l ist demzufolge nicht möglich.

p-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid kann in dieser Hinsicht als ein ideales Substrat gelten, da es

1. von der α -Amylase direkt zu *p*-Nitrophenyl- α -D-glucosid bzw. -maltosid gespalten wird. Es entstehen durch die amylytische Spaltung daher keine neuen Substrate der Amylase.
2. die Bildung von Glucose und NADH nicht gemessen wird, wodurch die Präinkubation und die Interferenz mit endogener Glucose wegfällt. Bei der Urinanalyse fällt deshalb auch die Störung durch NADH-Inhibitoren weg;
3. kontinuierlich gemessen werden kann; die lineare Phase erstreckt sich über 20 min;
4. das Substrat kühl und dunkel gelagert mehrere Monate haltbar ist.

Einen Nachteil bildet die lag-Phase, die mit verschiedenen Mengen an α -Glucosidase und *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid im Testansatz untersucht wurde und je nach Kombination der beiden Substanzen zwischen 6 und 11 min liegt. Sie bedeutet aber bei dem verwendeten Analysenverfahren keine zeitliche Einbuße, da erst nach 10 min der erste Wert gemessen wird.

Die nicht sehr gute Korrelation von 0,84 zwischen den mit *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid und Oligosaccharid ermittelten Amylase-Werten der Blutspenderseren ist darauf zurückzuführen, daß unter physiologischen Bedingungen in „normalem“ Serum die Amylase zu 35–50% dem Pankreas entstammt, und der Rest, also mehr als die Hälfte, aus den Speicheldrüsen kommt. Da bei Oligosaccharid-Methode und der *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid-Methode die Spezifitäten für Pankreas-amy-lase und Speichelamylase unterschiedlich sind (15), muß es entsprechend den Schwankungen der Speichelisoenzyme an der Gesamtfraktion zu unterschiedlichen Amylase-Verhältnissen aus *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid- und Oligosaccharid-Methode kommen, die sich schließlich in einem nicht sehr hohen Korrelations-

koeffizienten äußern. Diese Erklärung wird dadurch unterstützt, daß sich bei den Seren, wo die Oligosaccharid-Methode mehr Speichel-Isoenzyme anzeigt als die *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid-Methode, ein Amylase-Verhältnis \bar{x} Oligosaccharid- \bar{x} *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid-Methode von 7,9 ergibt; während dieses Verhältnis in den Duodenalsäften, wo beide Substrate nur Pankreasamylase nachweisen, bei 6,1 liegt. Auch der Korrelationskoeffizient zwischen Oligosaccharid- und *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid-Methode steigt bei den Duodenalsäften auf 0,995.

Eine weitere Erklärung der relativ schlechten Korrelation ergibt sich aus der nicht optimalen Präzision der Oligosaccharid-Methode mit einem VK von 9,3%.

Bei der Korrelation mit der Maltotetraose-Methode, die eine Präzision mit einem VK von 2,1% hat, ist der Korrelationskoeffizient $r = 0,87$.

Die schlechte Korrelation zwischen den mit Oligosaccharid- und *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid-Methode ermittelten Amylase-Werten bei den Blutspendern kann die Vorzüge von *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid als Substrat nicht schmälern. Dieses Substrat ist aus klinischer Sicht vor allem zur Analyse von Amylase

im Serum geeignet, was die untersuchten Pankreatitis-Seren zeigen. Die gezeigten Schwankungen der α -Amylase-werte sind hier typisch für den klinischen bzw. patho-biochemischen Status und das Stadium akuter Pankreaserkrankungen.

Bei den Urin-Untersuchungen ergibt sich mit 0,81 ebenfalls kein optimaler Korrelationskoeffizient. Jedoch muß gerade hierbei in Betracht gezogen werden, daß bei der Oligosaccharid-Methode die Absorption von NADH gemessen wird. Im Urin gibt es aber viele Inhibitoren für die Reaktion mit NADH. Diese Störfaktoren fallen beim α -Amylasetest mit *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid weg (2). Da sich klinisch die α -Amylasebestimmung mit *p*-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid als relevante Labor-methode herausstellt und andere α -Amylasetests mit definierten Substraten unter dem Nachteil vieler Hilfs-enzyme, langer Inkubationen, Interferenzen mit endogener Glucose, Störungen NADH-abhängiger Reaktionen und andere Methoden unter nicht klaren Substrat-Spaltungsverhältnissen leiden, kann die geprüfte Methode als eine gute, da standardisierbare Methode für die α -Amylasebestimmung angesehen werden, der die Chancen einer optimierten Standardmethode eingeräumt werden müssen.

Literatur

1. Wallenfels, K., Meltzer, B., Laule, G. & Janatsch, G. (1980) Fresenius Z. Anal. Chem. 301, 169–170.
2. Berk, J. E. & Fridlander, L. (1975) Mt. Sinai J. Med. 43, 321–337.
3. Hohenwallner, W., Wimmer, E. & Sommer, R. (1979) Ber. Österr. Ges. Klin. Chem. 2, 31–34.
4. Sky-Peck, H. H. & Thuvasehakul, P. (1977) Ann. Clin. Lab. Sci. 7, 298–309.
5. Kaufmann, R. A. & Tietz, N. W. (1980) Clin. Chem. 26, 846–853.
6. Legaz, M. E. & Kenny, M. A. (1976) Clin. Chem. 22, 57–62.
7. Saito, N., Horinchi, T., Yoshida, M. & Imai, T. (1979) Clin. Chim. Acta 97, 253–260.
8. Marshall, J. J. (1980) Clin. Biochem. 13, 4–5.
9. Meier, H., Henkel, E. & Dankert, H. (1979) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 709–716.
10. Lorentz, K. (1979) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 499–504.
11. Hanson, N. Q. & Yasmineh, W. G. (1978) Clin. Chem. 24, 762–768.
12. van Leeuwen, L. (1979) Clin. Chem. 25, 215–217.
13. Fenninger, H. & Gibitz, H. J. (1979) Ber. Österr. Ges. Klin. Chem. 2, 36–39.
14. Wallenfels, K., Földi, P., Niermann, H., Bender, H. & Linder, D. (1978) Carbohydrate Res. 61, 359–368.
15. Wallenfels, K., Meltzer, B., Laule, G. & Janatsch, G. (7–11 July 1980) Specificity Distinctiveness of the Different Forms of Mammalian α -Amylase, F. 5, Xth International Symposium on carbohydrate chemistry, Sydney.
16. Solling, K., Mogensen, C. E., Vittinghus, E. & Brock, A. (1979) Nephron 23, 282–286.
17. Jam, J., Shoham, M., Wolf, R. O. & Mishkin, S. (1978) Am. J. Gastroenterol. 70, 480–488.
18. Wallenfels, K., Laule, G. & Meltzer, B. (1982) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20, 581–586.
19. Rauscher, E., Buelow, S. U., Neumann, U. & Schaich, E. (1981) Ber. Österr. Ges. Klin. Chem. 4, 150.
20. David, H., McCroskey, R. & Müller, B. (1981) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19, 645.

Prof. Dr. med. J. D. Kruse-Jarres
Klinisch-Chemisches Institut
Katharinenhospital
Kriegsbergstr. 60
D-7000 Stuttgart 1

